

# **Lipid biomarkerek HPLC-HRMS vizsgálata történeti embertani minták tbc diagnosztikája során**

**Doktori értekezés tézisei**

**Váradi Orsolya Anna**

**Témavezetők:**

**Dr. habil Pálfi György, egyetemi docens, tanszékvezető**

**Dr. Szekeres András, tudományos főmunkatárs**

**Biológia Doktori Iskola**



**Szegedi Tudományegyetem**

**Természettudományi és Informatikai Kar**

**Embertani Tanszék és Mikrobiológiai Tanszék**

**2020**

**Szeged**

## BEVEZETÉS

A történeti korokban előforduló mikobakteriális megbetegségek diagnózisa multidiszciplináris megközelítést igényel. A legtöbb tuberkulózissal (tbc) összefüggésbe hozható csonttani elváltozást a betegség extrapulmonális megjelenési formái eredményezik (Aufderheide & Rodríguez-Martín, 1998; Marcsik et al., 1999, 2009; Pálfi & Marcsik, 1999; HersHKovitz et al., 2002; Maczel, 2003; Ortner et al., 2003; Paja et al., 2015; Pálfi & Molnár, 2009; Pálfi et al., 2012; 2015; Mariotti et al., 2015; Spekker, 2018; Spekker et al., 2018; Spekker et al., 2020a; Spekker et al., 2020b). A WHO becslései szerint extrapulmonális tbc-t mindössze az esetek 16%-ában regisztráltak 2019-ben (WHO, 2020). Továbbá az egyébként is viszonylag alacsony arányban megjelenő extrapulmonális tbc-s eseteknek csak egy kis százalékában alakulnak ki specifikus és detektálható csontelváltozások, ezért a makroszkópos paleopatológiai vizsgálatok önmagukban alábecsülik a tbc prevalenciáját a történeti embertani anyagok analízise során. A korábban élt népességek között fellelhető tbc-s esetek számának pontosabb becsléséhez ezért a makroszkópos vizsgálatok mellett, a csontokból és lágyszövetekből kivonható, specifikus biomarkerek azonosítására is szükség van, melyek segítségével a morfológiai alapon gyanúsnak ítélt esetek igazolhatók (Donoghue et al., 2017). A teljes genom szekvenálás alkalmazásával új utak nyíltak meg a paleopatológiai vizsgálatokban (Chan et al., 2013), melyek segítségével átfogó ismereteket lehet szerezni nem csak a fertőzést kiváltó *M. tuberculosis* törzs típusával kapcsolatban hanem azok számát illetően is (Bos et al., 2014; Kay et al., 2015). Az aDNS vizsgálatok eredményei jól kiegészíthetők még a lipid biomarker profilok vizsgálatával is (Donoghue et al., 2017).

Egy komplex, több lipid biomarker vizsgálatán alapuló módszert adtak közre David E. Minnikin és munkatársai 1993-ban. A módszerben a mikolsavak (MA), a tuberkulosztearin savak (TSA) és a mikocerozátok (MC) kerültek meghatározásra (Minnikin et al., 1993). Az extrahált lipideket szilárd fázisú extrakcióval (SPE) egy normál fázisú (NP)- majd egy reverz fázisú (RP) tölteten tisztították. A mikolsavakat a 9-antrilmetil származékképzést követően fluoreszcens detektorral (FLD) detektálták. A származékokat először egy NP-HPLC futás során a főbb típusaik szerint frakcionálták, majd ezeket a frakciókat RP-HPLC-n választották el. A TSA-k és MC-k származékképzéséhez pentafluorobenzol bromidot (PFB) alkalmaztak, melyeket gázkromatográfiás (GC) elválasztás után lángionizációs és elektron befogási detektorral mértek. Ez a módszer klinikai diagnosztikai felhasználásra készült, nem sokkal később történeti anyagból történő tbc kimutatásához is adaptálták kisebb változtatásokkal (Gernaey et al., 1998; Donoghue et al., 1998; Gernaey et al., 2001). Az átdolgozott módszert

egy 1400 éves kalcifikálódott pleura darab és egy kb. 1000 éves, makromorfológiai vizsgálatok szerint tbc-pozitívnek határozott egyén, két bordamintájának mikolsav analízisén keresztül vezették be a paleopatológiai vizsgálatok eszköztárába. E módszer egy újabb és érzékenyebb változatát Hershkovitz és munkatársai közölték 2008-ban (Hershkovitz et al., 2008). A módszer bemutatásához használt minták egy együtt eltemetett felnőtt nő és egy gyermek vázából származtak, melyeken tbc-vel összefüggésbe hozható csonttani elváltozásokat regisztráltak. A leletek egy Atlit-Yam nevű neolitikumi lelőhelyről származtak, melynek korát megközelítőleg 9000 évesnek határozták meg. A kivont lipideket PFB-vel származékképezték, majd egy NP-SPE frakcionálást követően a PFB-MA frakciókat származékképezték pirenil-vajsavval (PBA), majd RP-SPE-val tisztították. A PBA-PFB-MA származékokat tartalmazó frakciókat RP-HPLC-FLD módszerrel elválasztották és ismét frakciókat gyűjtöttek. A célmolekulákat tartalmazó frakciókból ezt követően NP-HPLC-FLD eljárással elválasztották az alfa-, metoxi- és keto-mikolsavakat. A külön-külön gyűjtött mikolsav típusokat külön RP-HPLC-FLD futásokkal analizálták. A tanulmányban szerint mind a két egyén tbc fertőzését sikeresen azonosították nem csak aDNS alapján, hanem mikolsav analízissel is.

A mikolsavak azonosítására egy másik megközelítés az elmúlt évtized első felében leírt tömegspektrometriás (MS) analízisen alapszik. A módszert az előbbihez hasonlóan, eredetileg tbc klinikai diagnózisához fejlesztették ki (Szewczyk et al., 2013). A kimutatás HPLC-MS/MS mérésen alapul, ESI ionforrás alkalmazásával. Az analízis során a 10 legnagyobb mennyiségben előforduló, *M. tuberculosis*-ra jellemző mikolsavat vizsgálták többszörös reakciókövetés módban (MRM). A mintaelőkészítés során származékképzésre nem volt szükség, valamint a mintákat elválasztás nélkül analizálták, így a vizsgálat viszonylag rövid idő alatt elvégezhető. Az eljárás közzlése után egy évvel, a módszert történeti embertani anyagon is alkalmazták (Borowska-Strugińska et al., 2014). A minták egy 30-50 év körüli férfi neolitikus korabeli csonttani leletanyagából származtak. A vizsgált egyén esetében a makroszkópos vizsgálat tbc fertőzés jelenlétét feltételezte. A tbc fertőzés igazolására a korábban leírt módszert alkalmazták, melyet további MRM átmenetek bevonásával egészítettek ki. A csontanyagban megfigyelt MA profil hasonló volt a referencia *M. tuberculosis* törzs MA mintázatához. Ezeket a lipid biomarker alapú eredményeket PCR alapú aDNS vizsgálattal is igazolták.

Szintén egy lipid biomarker alapú, paleopatológiai alkalmazásra kifejlesztett módszer került bemutatásra 2009-ben, melyben a mikocerozát (MC) mintázat alapján, illetve a C27-es mikolipenát (ML) jelenléte alapján következtettek a tbc fertőzés jelenlétére (Redman et al., 2009). Az optimalizált módszer teszteléséhez és bemutatásához felhasznált minták a „Coimbra

*Identified Skeletal Collection*” részét képező embertani maradványokból származtak. A vizsgálatba a C27 ML mellett a C26, C27, C29, C30, C32, C33, C34 MC-eket és vonták be. Az extrahált MC-t és ML-t tartalmazó frakciókat először PFB-vel származékképezék majd további extrakciót követően NP-SPE-n tisztították. Az így kinyert frakciókat NP-HPLC-n vizsgálták, mely során a többszörös metil elágazást tartalmazó zsírsavak, mint például a mikocerozátok PFB-vel képzett észterei elváltak az egyéb PFB-zsírsav észterektől. Az összegyűjtött PFB-észtereket ezután GC-MS-el analizálták. A mérésekhez negatív kémiai ionizációt alkalmaztak, a keletkezett ionokat kiválasztott ion követéssel (SIM) vizsgálták. A módszer optimalizálásához használt *M. tuberculosis* sejtekből a C29, C30 és C32 MC-eket valamint a C27 ML-t sikerült kivonni a legnagyobb mennyiségben. A 49 vizsgált csont minta közül 33 esetben kaptak pozitív eredményt. A 33 MC alapján pozitívnak határozott eset közül 22-nél az egyéni adatok között is szerepelt a pulmonális tbc fertőzés, és csupán 2 olyan egyénnél kaptak negatív eredményt, akiknél szintén feltüntették a pulmonális tbc-t.

A makroszkópos, az aDNS és lipid biomarker alapú módszerek egymást segítő, együttes alkalmazása számos esetben vezetett már jól alátámasztott tbc kimutatáshoz történeti anyagokban (pl.: Donoghue et al., 1998; Gernaey et al., 1998; HersHKovitz et al., 2008; Donoghue et al., 2010; Lee et al., 2012; Baker et al., 2015; Lee et al., 2015; Masson et al., 2015; Minnikin et al., 2015; Molnár et al., 2015; Luna et al., 2020; Donoghue et al., 2017).

Az új módszerek igazolásához és az új makromorfológiai markerek megbízhatóságának becsléséhez általában jól dokumentált, az antibiotikumok előtti időszakból származó csont és múmia gyűjteményeket használnak a paleopatológiában (Roberts et al., 1994; Santos & Roberts, 2001; 2006; Pálfi et al., 2012; Spekker, 2018; Spekker et al., 2020a; 2020b). A Váci Múmiák gyűjteménye az egyike ezeknek a jól dokumentált és széles körben tanulmányozott gyűjteményeknek, melynek nagy előnye, hogy az egyének korában lejegyzett vonatkozó adatok mellett számos tbc-vel kapcsolatos kutatási eredmény is rendelkezésre áll (Szikossy et al., 1997; Pap et al., 1999; Fletcher et al., 2003; Chan et al., 2013; Kay et al., 2015; Pap et al., 2017). Mivel ezek a múmiák a modern korból, de még az antibiotikumok elterjedése előttől származnak, rendkívül jó kapcsolatot képeznek a kortárs és régészeti minták között. A múmiák kora egybe esik azzal az időszakkal, amikor a tuberkulózis egyre növekvő terhet rótt egész Európára, beleértve Magyarországot is. Továbbá a makroszkópos vizsgálatok során egyes egyéneknél felmerült a tbc fertőzés gyanúja, ezért egy aDNS alapú kiterjedt szűrővizsgálatot végeztek az érintett esetek felkutatására (Fletcher et al., 2003). Fletcher és munkatársai 168 egyénből származó 350 mintát vizsgáltak, ahol az analízisbe bevont mintákat a tüdőből,

pleurából, hasi régióból, bordából, hajból, fogakból és ruházatból vették ki. Az általuk közzétett tanulmány eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált egyének 55%-a *M. tuberculosis* complex (MTBC) fertőzött volt.

## CÉLKITŰZÉSEK

Számos esetben igazolták már a MA, MC és C27 ML alapú kimutatási módszerek alkalmazhatóságát a tbc fertőzés detektálására történeti anyagokon, azonban az eddigi módszerek hosszú mintaelőkészítési eljárásokat tartalmaztak és végrehajtásuk speciális felkészültséget igényelt (Hershkovitz et al., 2008; Redman et al., 2009; Lee et al., 2012; Donoghue et al., 2017).

Célunk az volt, hogy egy olyan lipid biomarker alapú HPLC-MS módszert hozzunk létre tbc fertőzések történeti embertani vizsgálatokban történő azonosításához, melyhez a szükséges műszerek számos laboratóriumban elérhetők, valamint egy gyors és érzékeny, mindeközben gazdaságos eljárás lehetőségét rejti magában. A dolgozat legfőbb célkitűzései a következő pontokra oszthatók fel:

1. HPLC-MS módszer fejlesztése és optimalizálása a két leggyakrabban használt lipid biomarker csoport kimutatására.
2. Mikolsav és mikocerozát profil könyvtár létrehozása, ami a későbbi kutatások során referenciaként szolgál a diagnózis felállításához.
3. A létrehozott lipid biomarker alapú módszer tesztelése 6 váci múmiából származó csont és lágy szövet mintán.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az azonosítási eljárások kifejlesztése során kezdetben két referencia törzset *M. tuberculosis* H37Rv (NR-49098) és *M. bovis* (NR-31210), valamint David E. Minnikin által biztosított MA standardot használtunk fel. A referencia törzsek az „*American Type Culture Collection*”-ből (ATCC) és a BEI Resources-től (Manassas, Virginia, USA) származtak. A módszer teszteléséhez 5 *M. tuberculosis* complex törzset használtunk fel (az izolált törzsek laboratóriumi azonosítója: MTBC-1/2015; MTBC-254/2000; MTBC-3910/2014; MTBC-242/2000; és MTBC-1/8508/2014), melyeket pulmonális tuberkulózissal diagnosztizált egyénekből izoláltak. Továbbá 8 NTM különböző eredetű NTM fajt vontunk be a vizsgálatokba (*M. kansasii* 1959/2018, *M. chelonae* 16/2018, *M. goodii* 389/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. avium* 16229/2018, *M. chimaera* 619/2018, *M. abscessus ssp. abscessus* 180/2018, and *M.*

*fortuitum* complex 3/2018). A mikocerozát kimutatási módszer teszteléséhez 6 váci múmiából származó csont és lágyyszövet mintát vizsgáltunk. A mintázott egyének korábbi aDNS vizsgálatok eredményei szerint tbc-pozitívak voltak. A kiválasztott egyének felnőttek voltak, 4 nő és 2 férfi. A vizsgált múmia minták (mind csont mind lágyyszövet minták) a mellkas régióból származtak. A vizsgálatok Shimadzu LC-10AD VP HPLC-hez kapcsolt Shimadzu LCMS-2010A Single Quadrupole tömegspektrométeren (MS), valamint egy Dionex Ultimate 3000 UHPLC-hez kapcsolt (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) Q-Exactive Plus MS-en (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) történt. Az elválasztáshoz Gemini – NX C18 (3  $\mu$ m, 110Å, 50 mm x 2 mm) oszlopot (Phenomenex, Torrance, California, USA) használtunk.

A mikolsav kimutatási módszer fejlesztése során 5 különböző eluens összetételt teszteltünk az egyszeres quadrupole LCMS rendszeren, és 14 eluens összetételt a HPLC-Orbitrap MS rendszeren, elválasztás nélkül, ion forrásként ESI-t alkalmaztunk. A megfigyelt MA csúcsok igazolásához az ionokat párhuzamos reakció megfigyelés (PRM) módban fragmentáltuk, 70 kV ütközési energiával. A mikocerozátokat vizsgáltuk mind grádiens elúciós elválasztással, mind elválasztás nélkül. A módszer optimalizáció során az ESI és APCI ionforrás hatékonyságát is teszteltük negatív ion módban.

## **EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK**

A vizsgált MA csúcsok azonosításához két megközelítést alkalmaztunk. Elsőként a megfigyelt tömegspektrumon a kiválasztott csúcsokon felül további mikolsavakat detektáltunk, melyek a mért  $m/z$  értékeik szerint besorolhatók voltak 28 Dalton (két metil-csoport) különbséget mutató sorozatokba. Ez a tömegkülönbség a mikolsav homológokra jellemző, azok bioszintézis útvonalát követi (Takayama et al., 2005). A mikoslavakat ezután PRM üzemmódban vizsgáltuk, melynek segítségével a két legjellemzőbb, mások által is gyakran detektált, az  $m/z$  365,35767 és 395,38901 fragmenseket azonosítottuk, melyek a C24 és C26  $\alpha$ -alkil láncnak felelnek meg (Szewczyk et al., 2013; Song et al., 2009; Bhamidi et al., 2011; Lehmann et al., 2018). Az optimalizációs lépések során a kapilláris és a szárítógáz hőmérsékletének, valamint a kapilláris és az S-lencse feszültségének növelésével a csúcsok mért intenzitása is emelkedett az alkalmazott eluens összetételtől függetlenül, mind a mikolsavak, mind a mikocerozátok esetében.

Az aDNS vizsgálatokkal ellentétben természetesen nincs lehetőség a kivont lipid biomarkerek felsokszorosítására, így az extrakció hatékonysága kiemelten fontos, ezért a mintaelőkészítési

protokollt is optimalizáltuk. A szappanosításhoz használt kálium-hidroxid (KOH) oldat esetében a 20% és 30% KOH-koncentráció alkalmazása nem mutatott hatásfokbeli különbséget, azonban a koncentráció 10%-ra történő csökkentése negatívan befolyásolta a mikolsav kihozatalát. Az extrakciós oldószerek tesztelése során a hexán izomer elegy alkalmazása növelte az alfa- és metoxi-mikolátok extrakciójának hatékonyságát, viszont csökkentette a keto-mikolátok kihozatalát, ezért az eredetileg alkalmazott három ismétlésben történő toluolos extrakció került kiegészítésre egy negyedik, hexános extrakciós lépéssel.

Az optimalizált módszerrel ezután megkezdtük egy mikobakteriális mikolsav könyvtár felépítését, amely a későbbi vizsgálatok során referenciaként szolgálhat 5 MTBC (MTBC-1/2015, MTBC-254/2000, MTBC-3910/2014, MTBC-242/2000, MTBC-1/8508/2014) és 5 NTM (*M. gordonae* 389/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. abscessus ssp. abscessus* 180/2018, *M. kansasii* 1959/2018 és *M. chelonae* 16/2018) törzs felhasználásával. Az összes MTBC törzs esetében a legnagyobb arányban előforduló mikolsav az  $\alpha$ -C78 volt. A második legnagyobb mennyiségben előforduló mikolsavak az  $\alpha$ -C80 és a m-C85 voltak, továbbá a m-C87 mikolsav is magas arányban volt jelen. Az  $\alpha$ -C82, m-C88, k-C87 és a m-C89 mikolsavak magasabb, mint 5%-os arányban fordultak elő. Az egyes mikolsavak csúcsterület értékeit típusonként is összegeztük, azok egymáshoz viszonyított arányát is vizsgáltuk. Az 5 klinikai MTBC izolátum vizsgálata során 4 esetben az alfa-mikolsavak voltak jelen a legnagyobb arányban, mintegy 40%-50%-ban, míg egy törzs esetében a metoxi-mikolátok voltak a legnagyobb relatív mennyiségben, melyek a többi törzs esetében az alfa-mikolsavaknál kisebb arányban, körülbelül 40%-ban voltak jelen. Legkisebb mennyiségben a keto-mikolsavakat detektáltuk az összes vizsgált törzsben. A nem-tuberkulotikus *Mycobacterium* fajok esetében szintén az  $\alpha$ -C78 mikolsav volt jelen a legnagyobb mennyiségben, azonban a hosszabb alkil-lánccal rendelkező alfa-mikolátok, valamint a keto- és metoxi-mikolsavak kisebb mennyiségben voltak reprezentáltak. Habár a NTM fajok mikolsav profiljára vonatkozó irodalmi adatok nagyobb változatosságot mutatnak (Song et al., 2009; Shui et al., 2011; Szewczyk et al., 2013; Minnikin & Brennan, 2020) és a mintánk elemszáma sem teszi lehetővé statisztikai következtetések levonását, úgy tűnik, hogy a HPLC-MS-el felvett lipid profilok alkalmazása – a metoxi- és keto mikolsavak alacsony előfordulási aránya révén – lehetővé teszi az MTBC és a NTM tagok elkülönítését. Mindazonáltal ennek megerősítéséhez a könyvtár további bővítésére van szükség.

A mikocerozát alapú kimutatási módszer esetében, szintén egy lipid könyvtár felépítésével folytattuk a munkát. Az 5 vizsgált klinikai MTBC izolátum közül négyben, illetve a *M.*

*tuberculosis* H37Rv standard törzs esetében a C32-es mikocerozát volt jelen a legnagyobb mennyiségben, a C29-es, valamint C30-as mikocerozát egymással közel azonos mennyiségben volt kimutatható, míg a legkisebb intenzitást a C27-es és a C33-as mikocerozátok mutatták. Egy klinikai MTBC törzset kizártunk a *Mycobacterium tuberculosis*-ra jellemző átlag mikocerozát eloszlás számításából, mivel annak mikocerozát profilja jobban korrelált a referencia *M. bovis* törzs esetében megfigyeltéhez. A vizsgált NTM fajok közül (*M. avium* 16229/2018, *M. chelonae* 16/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. fortuitum* 3/2018, *M. gordonae* 389/2018, *M. abscessus sp. abscessus* 180/2018, *M. chimaera* 619/2018, *M. kansasii* 1959/2018) a *M. kansasii* mikocerozát profilja volt megállapítható, mivel a többi vizsgált NTM faj sejtfala nem tartalmaz mikocerozátokat. A megfigyelt baktérium profilok alapján a pozitív tuberkulózis diagnózis kritériumaként a kiugró C32, illetve az ezzel együtt előforduló magas C29 és C30 csúcsok detektálásában határoztuk meg. A vizsgáltba bevont mumifikálódott egyének közül 4 esetében *M. tuberculosis*-ra jellemző mikocerozát profilt rögzítettünk, míg 2 egyénből származó minták vizsgálata negatív eredményt adott. A 12 vizsgált minta közül 6 esetében (4 lágy szövet, 2 borda) 4 mikocerozát jelenlétét detektáltuk, míg 2 minta vizsgálata során csak 3 mikocerozát jelenléte volt kimutatható. A C27-es mikocerozát egyetlen esetben sem érte el a detektálási limitet. A két, korábban pozitív aDNS eredményt mutató egyén esetében, akiknél a mikocerozát analízis negatív eredményt adott, az eltérés a vizsgált minta különbségéből is fakadhat. A mumifikálódott egyének vizsgálata sokkal több lehetőséget nyújt a mintaválasztásban, a lágyszöveteket nélkülöző szkeletizált maradványokkal szemben. Bár a #25 és #79-es egyénekhez tartozó minták negatívnak adódtak, nagyon gyenge jeleket megfigyeltünk, amik az egyénekből származó további minták későbbi vizsgálatát indokoltá teszik.

## KÖVETKEZTETÉSEK ÉS PERSPEKTÍVÁK

1. A tbc diagnosztizálását lehetővé tevő, történeti embertani leleteken is alkalmazható, lipid biomarkereken alapuló HPLC-HRMS módszer kifejlesztése során az első lépés az alkalmazott HPLC és MS paraméterek finomhangolása volt annak érdekében, hogy hatékonyan detektálni tudjuk a mikolsavakat és mikocerozátokat, valamint optimalizálni tudjuk a mintaelőkészítési folyamatot. A munka kezdeti szakaszában, a HPLC-MS vizsgálatok során egy egyszeres quadrupole analízátorral sikeresen azonosítottuk az MTBC-re jellemző mikolsav típusokat, a későbbiekben alkalmazott OrbiTrap analízátor azonban érzékenyebb és szélesebb körű vizsgálatokat tett lehetővé.



A mikolsavak kimutatására alkalmas módszer fejlesztése során 5 különböző eluensösszetételt teszteltünk az egyszeres quadrupole készüléken, 14-et pedig az Orbitrap MS-en. Kezdeti méréseink során a kloroform alkalmazása előnyösnek tűnt az egyszeres quadrupole készüléken, ugyanakkor a magas kloroform koncentráció negatívan befolyásolta a mikolsavak ionizációját az Orbitrap MS-en. A heptán mint apoláris eluens összetevő alkalmazásával növelni tudtuk a csúcsok intenzitását és alkalmazásával kifejlesztettünk egy a mikolsavak és mikocerozátok elválasztását és egyidejű detektálását lehetővé tevő módszert is. Az egyszeres quadrupole készüléken egy eluens összetétellel, az Orbitrap MS-en pedig két eluens összetétellel optimalizáltuk az MS paramétereket a mikolsavak detektálásához. A mikocerozátok kimutatásához egy eluens összetétel alkalmazásával finom hangoltuk az MS paramétereket. Az optimalizációs lépések során a magasabb kapilláris- és szárítógáz-hőmérséklet, valamint a megnövelt kapilláris- és S-lencse feszültség pozitív hatását figyeltük meg – az alkalmazott eluens összetételtől függetlenül nagyobb lett a csúcsok intenzitása. A mikocerozátok kimutatására alkalmas módszer optimalizációja során az APCI-val szemben az ESI bizonyult a hatékonyabb ionforrásnak, ami az előbbivel szemben egy lágyabb ionizációt biztosító ionforrás (Yunker et al., 2014). A mikolsavak kinyerésére szolgáló mintaelőkészítési protokoll optimalizációja során a kiindulási elszappanosításra alkalmazott keverék KOH-koncentrációját teszteltük. A 20%-os és a 30%-os KOH-koncentráció esetén semmilyen különbséget sem tapasztaltunk, ugyanakkor 10% koncentráció esetén kevesebb mikolsavat lehetett kinyerni. A KOH-koncentráció optimalizálása mellett 5 különböző oldószert/oldószerkeveréket hasonlítottunk össze. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy habár az extrakcióhoz szükség van apoláris oldószerekre, az apolárisabb oldószer alkalmazása nem jelent nagyobb hatékonyságot.

2. Az optimalizált módszerek alkalmazása révén lehetőségünk nyílt egy lipid profil könyvtár felépítésére mind a mikolsavak, mind a mikocerozátok esetében. Öt klinikai MTBC izolátum (MTBC-1/2015, MTBC-254/2000, MTBC-3910/2014, MTBC-242/2000 és MTBC-1/8508/2014) és 5 db klinikai NTM izolátum (*M. gordonae* 389/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. abscessus ssp. abscessus* 180/2018, *M. kansasii* 1959/2018 és *M. chelonae* 16/2018) mikolsav profilját határoztuk meg. Habár a NTM fajok mikolsav profiljára vonatkozó irodalmi adatok nagyobb változatosságot mutatnak (Song et al., 2009; Shui et al., 2011; Szewczyk et al., 2013) és a mintánk elemszáma sem teszi lehetővé statisztikai következtetések levonását, úgy tűnik, hogy a HPLC-MS-el felvett lipid profilok alkalmazása – a metoxi- és keto mikolsavak alacsony előfordulási aránya révén – lehetővé teszi az MTBC és a NTM tagok

elkülönítését. Mindazonáltal ennek megerősítéséhez a könyvtár további bővítésére van szükség. A mikocerozát könyvtár felépítéséhez 5 klinikai MTBC izolátumot (MTBC-1/2015, MTBC-254/2000, MTBC-3910/2014, MTBC-242/2000 és MTBC-1/8508/2014), a *M. tuberculosis* és a *M. bovis* referenciatörzseit, valamint 8 db klinikai NTM izolátumot (*M. avium* 16229/2018, *M. chelonae* 16/2018, *M. intracellulare* 7802/2017, *M. fortuitum* 3/2018, *M. gordonae* 389/2018, *M. abscessus sp abscessus* 180/2018, *M. chimaera* 619/2018 és *M. kansasii* 1959/2018) használtunk fel. Az 5 MTBC izolátum közül 4-nél, valamint a *M. tuberculosis* H37Rv referencia törzs esetében olyan mikocerozát mintázatot tapasztaltunk, ami a szakirodalomban leírtak alapján a *M. tuberculosis*-nak felel meg (Redman et al., 2009; Lee et al., 2012), míg egy esetben a mikocerozátok mintázata *M. bovis*-ra utalt. A vizsgált NTM fajok közül egyedül a *M. kansasii* profilját határoztuk meg, mert a többi faj sejtfala nem tartalmaz mikocerozátokat. A vizsgált *M. avium* törzs esetén a C27 mikocerozáttal együtt eluálódó csúcsot detektáltunk, ami további vizsgálatokat tesz szükségessé. A könyvtárépítést követően – a megfigyelt profilok alapján – a pozitív tuberkulózis eseteket a kiugró C32, illetve az ezzel együtt előforduló magas C29 és C30 csúcsok detektálása jelentette a módszer tesztelése során.

3. A kifejlesztett lipid biomarker alapú módszer hatékonyságát egy széles körben tanulmányozott múmiagyűjteményen, a Váci múmiák gyűjteményén vizsgáltuk. A mikolsavak detektálása során az apoláris oldószert is tartalmazó eluens összetétel ellenére a mikolsavak elúciója nem volt teljes. Mivel a mérések során minimális átszennyezést sem engedhettünk meg, végül csak a mikocerozátokra kifejlesztett módszert teszteltük. Míg a vizsgáltba bevont mumifikálódott egyének közül 4 esetben a *M. tuberculosis*-ra jellemző mikocerozát profilt rögzítettünk, addig 2 másik egyén esetében a minták vizsgálata negatív eredményt adott. Korábban az összes vizsgált egyén tbc-pozitívnak bizonyult az aDNS vizsgálatok alapján, fontos azonban megjegyezni, hogy az általunk vizsgált minták nem azonosak a korábban használtakkal és a mintavétel helye erősen befolyásolhatja a vizsgálatok eredményét. A helyzet tisztázását segítené, tbc-pozitív egyéneken végzett nagy mintaszámú vizsgálatra, mely során számos mintavételi hely bevonásával történhetne a szűrés. A fent említett eltérés ellenére kijelenthető, hogy eredményeink további megerősítéssel és adatokkal szolgálnak a Váci múmiák között széles körben elterjedt tbc fertőzésről. A kifejlesztett HPLC-ESI-MS módszer új utat nyit a mikocerozátok kimutatásában, mellyel a mikobakteriális fertőzések a történeti anyagokban is detektálhatók, magában foglalva nem csak a tuberkulotikus, de a leprás megbetegedéseket is, illetve azok ko-infekciós megjelenését. Napjainkban a kivitelezéshez szükséges műszerezettség számos laboratóriumban megtalálható és további technikai

fejlesztéssel az eljárás komplexitása és költsége tovább csökkenthető, míg érzékenysége növelhető. A módszer nagy előnye, hogy a célzott lipidek kimutatása nem igényel kémiai származékképzést, a szabad lipidek önmagukban detektálhatók. A későbbiekben tervezzük a módszer bővítését a C27-es mikolipenát bevonásával, ami a pentaacil-trehalózok *M. tuberculosis*-ra jellemző specifikus acil-összetevője (Donoghue et al., 2017). Bár módszerünkben egyelőre nem oldottuk meg a mikolsavak maradéktalan elúcióját, új eluensek és új megközelítési módok bevonásával egy átfogó, kombinált módszer létrehozása valószínűnek tűnik (Donoghue et al., 2017). A paleopatológiában elterjedtebben alkalmazott HPLC-FLD módszer érzékenysége és pontossága több ízben bizonyított (HersHKovitz et al., 2008; Donoghue et al., 2017), a diagnosztikus mikolsav profil felvételéhez hosszadalmas származékképzési eljárás, valamint egymást követő RP- és NP-HPLC elválasztás szükséges. Ezzel ellentétben egy egyszerű HPLC-MS módszer alkalmazásával a diagnosztikus mikolsavak detektálása egy gyorsabb és egyszerűbb lehetőséget kínálhat.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA (MTMT azonosító: 10053024)

### A DOKTORI ELJÁRÁS ALAPJÁT KÉPEZŐ 2 KÖZLEMÉNY:

**Váradi OA**, Rakk D, Spekker O, Terhes G, Urbán E, Berthon W, Pap I, Szikossy I, Maixner F, Zink A, Vágvolgyi Cs, Donoghue HD, Minnikin DE, Szekeres A, Pálfi Gy. (2020) Verification of tuberculosis infection among Vác mummies (18th century CE, Hungary) based on lipid biomarker profiling with a new HPLC-HESI-MS approach. Tuberculosis. Elfogadott, publikálás alatt. **IF<sub>2019</sub>: 2.576**

Spekker O, Schultz M, Paja L, **Váradi OA**, Molnár E, Pálfi Gy, Hunt DR. (2020) Tracking down the White Plague. Chapter two: The role of endocranial abnormal blood vessel impressions and periosteal appositions in the paleopathological diagnosis of tuberculous meningitis. PLOS ONE. 15(9): e0238444. DOI: 10.1371/journal.pone.0238444. **IF<sub>2019</sub>: 2,740**

### REFERÁLT FOLYÓIRATBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK:

**Váradi OA**, Horváth O, Marcsik A, Molnár E, Pálfi Gy, Bereczki Zs. (2015) Különleges formájú jelképes trepanációk a Dél-Alföldről. Anthropologiai Közlemények. **56**: 91–104.

Spekker O, Hunt DR, **Váradi OA**, Berthon W, Molnár E, Pálfi Gy. 2018. Rare manifestations of spinal tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA). International Journal of Osteoarchaeology 28(3): 343–353. DOI: 10.1002/oa.2658. **IF<sub>2018</sub>: 1.180**

Spekker O, Schultz M, Paja L, **Váradi OA**, Molnár E, Pálfi Gy, Hunt DR. (2020) Tracking down the White Plague. Chapter two: The role of endocranial abnormal blood vessel impressions and periosteal appositions in the paleopathological diagnosis of tuberculous meningitis. PLOS ONE. 15(9): e0238444. DOI: 10.1371/journal.pone.0238444. **IF<sub>2019</sub>: 2.740**

Tihanyi B, Berthon W, Kis L, **Váradi OA**, Dutour O, Révész L, Pálfi Gy. (2020) “Brothers in arms”: Activity-related skeletal changes observed on the humerus of individuals buried with and without weapons from the 10th-century CE Carpathian Basin. International Journal of Osteoarchaeology. DOI: 10.1002/oa.2910. **IF<sub>2019</sub>: 1.228**

**Váradi OA**, Rakk D, Spekker O, Terhes G, Urbán E, Berthon W, Pap I, Szikossy I, Maixner F, Zink A, Vágvolgyi Cs, Donoghue HD, Minnikin DE, Szekeres A, Pálfi Gy. (2020) Verification of tuberculosis infection among Vác mummies (18th century CE, Hungary) based on lipid biomarker profiling with a new HPLC-HESI-MS approach. Tuberculosis. Accepted, in press. **IF<sub>2019</sub>: 2.576**

**Az impact faktorok összege: 7.724**

## KONFERENCIAKÖTETBEN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK:

Bereczki Zs, **Váradi OA**, Molnár E, Marcsik A, Medgyesi P, Pálfi Gy. (2016) Possible signs of ritual healing observed in the 7–8th c. AD Avar Age site of Császárszállás-Hanzély tanya (MRT 10. 385. 4/21. LH.). In: Gál SzS (ed.): The Talking Dead. New Results from Central and Eastern European Osteoarchaeology. Proceedings of the First International Conference of the Török Aurél Anthropological Association from Târgu Mureş. Mega Publishing House. Cluj-Napoca, Romania. 19–27.

**Váradi OA**, Kecskeméti A, Spekker O, Molnár E, Bereczki Zs, Szekeres A, Vágvolgyi Cs, Pálfi Gy. (2016) Cases of tuberculosis infection verified by lipid biomarker analysis in Hungarian archaeological samples. In: Gál SzS (ed.): The Talking Dead. New Results from Central and Eastern European Osteoarchaeology. Proceedings of the First International Conference of the Török Aurél Anthropological Association from Târgu Mureş. Mega Publishing House. Cluj-Napoca, Romania. 129–142.

Spekker O, Hunt DR, Paja L, **Váradi OA**, Molnár E, Pálfi Gy. (2018) Endocranial bony changes probably related to tuberculous meningitis – Example cases from the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (Washington, DC, USA). In: Gál SzS (ed.): The Talking Dead 2. Past and Present of Biological Anthropology. The Heritage of Török Aurél's Oeuvre. New Results from Ancient Tuberculosis and Leprosy Research. Proceedings of the Second International Conference of the Török Aurél Anthropological Association from Târgu Mureş. Mega Publishing House. Cluj-Napoca, Romania. 81–90.

**Váradi OA**, Rakk D, Spekker O, Terhes G, Urbán E, Bereczki Zs, Vágvolgyi Cs, Pálfi Gy, Szekeres A. (2018) Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and the non-tuberculous *Mycobacterium gordonae* via high resolution mass spectrometric technique. In: Gál SzS (ed.): The Talking Dead 2. Past and Present of Biological Anthropology. The Heritage of Török Aurél's Oeuvre. New Results from Ancient Tuberculosis and Leprosy Research. Proceedings of the Second International Conference of the Török Aurél Anthropological Association from Târgu Mureş. Mega Publishing House. Cluj-Napoca, Romania. 137–143.

## KONFERENCIASZEREPLÉSEK:

### Hazai konferenciaszereplések:

Szuhaj M, **Váradi OA**, Rákhely G, Kovács LK, Bagi Z. (2015) Utilization of hydrogen in mesophilic biogas fermentors. In MTA SZBK Straub-Napok (Szeged, Hungary, 3–4 June 2015). MTA SZBK, Szeged, Hungary.

Tihanyi B, Balázs J, Berthon W, Király K, Kis L, Spekker O, **Váradi OA**, Bereczki Zs, Molnár E, Marcsik A, Pálfi Gy. (2019) Az SZTE Embertani Tanszék kutatásai az “Árpád-kori magyarság embertani-genetikai képe” című projekt keretében. In: A Magyar Biológiai Társaság Embertani Szakosztályának 398. Szakülése (Szeged, Hungary, 9 October 2019). Department of Biological Anthropology, University of Szeged: Szeged, Hungary.

### **Nemzetközi konferenciaszereplések:**

Bagi Z, Szuhaj M, **Váradi OA**, Ács N, Rákhely G, Kovács LK. (2014) The relationship between hydrogen metabolism and biogas production, regulation mechanisms. In: Conference Proceedings for the International Scientific Conference Biogas Science 2014: International Conference on Anaerobic Digestion (Vienna, Austria, 26–30 October 2014). University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria; 144–145.

**Váradi OA**, Horváth O, Bereczki Zs. (2014) Szilvماغ alakú jelképes trepanációk a Kárpát-medencében. In: 13<sup>th</sup> International Conference on Applications of Natural, Technological and Economic Sciences (Szombathely, Hungary, 17 May 2014). Abstracts of the Presentations. Nyugat-magyarországi Egyetem, Szombathely, Hungary. 25.

Bereczki Zs, **Váradi OA**, Horváth O, Marcsik A, Molnár E, Pálfi Gy. (2015) Healing and sexual symbolism – Avar trephinations in the 7–9th century AD Carpathian basin. In: 11<sup>th</sup> Meeting of the Society for Anthropology (GfA). Evolutionary and Modern Challenges to Homo sapiens – An Anthropological Inquiry (Munich, Germany, 15–18 September 2015). Abstract and Program Booklet. Munich, Germany. 15.

Spekker O, Lovász G, Masson M, Pósa A, Mészáros K, **Váradi OA**, Neparácski E, Maczel M, Marcsik A, Schultz M, Nerlich A, Minnikin DE, Donoghue HD, Maixner F, Zink A, Dutour O, Paja L, Bereczki Zs, Molnár E, Pálfi Gy. (2015) On the traces of ancient tuberculosis: a preliminary summary of the tuberculosis paleopathology research in the Szeged Anthropological Collection from the 1970's to the present day. In: 11<sup>th</sup> Meeting of the Society for Anthropology (GfA). Evolutionary and Modern Challenges to Homo sapiens – An Anthropological Inquiry (Munich, Germany, 15–18 September 2015). Abstract and Program Booklet. Munich, Germany. 100–101.

**Váradi OA**, Tihanyi B, Horváth O, Marcsik A, Molnár E, Pálfi Gy, Bereczki Zs. (2015) Symbolic trephinations of extraordinary shape in the Carpathian Basin. In: 1<sup>st</sup> Conference of the Anthropological Association „Aurél Török” (Târgu Mureş, Romania, 13–15 November 2015). Târgu Mureş, Romania. 4.

Spekker O, Molnár E, Lovász G, Marcsik A, Masson M, Bereczki Zs, Paja L, Balázs J, **Váradi OA**, Neparácski E, Pósa A, Maixner F, Zink A, Perrin P, Coqueugniot H, Dutour O, Pálfi Gy. (2016) Paléopathologie infectieuse chez des sujets immatures: exemple de la tuberculose. Résultats de 45 ans de recherche effectuée dans la collection anthropologique de Szeged. In: Groupe des Paleopathologistes de Langue Française. Colloque 2016 (Toulouse, France, 11–12 March 2016). Programme and Volume des Résumés. Faculté de médecine Purpan, Université de Paul Sabatier Toulouse, Toulouse, France. 19.

Spekker O, Molnár E, Marcsik A, Lovász G, Masson M, Maczel M, Pósa A, Neparácski E, **Váradi OA**, Schultz M, Nerlich A, Minnikin DE, Donoghue HD, Maixner F, Zink A, Dutour O, Bereczki Zs, Paja L, Pálfi Gy. (2016) On the traces of ancient tuberculosis: possibilities of the macromorphological diagnosis of tuberculosis in prehistoric and historic osteological series – Skeletal tuberculosis cases from the Szeged Anthropological Collection. In: Working Your Fingers to the Bone – An Interdisciplinary Conference on Identifying Occupation from the

Skeleton (Coimbra, Portugal, 6–8 July 2016). Program and Abstract Book. Department of Life Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal. 46.

**Váradi OA**, Kecskeméti A, Spekker O, Molnár E, Bereczki Zs, Szekeres A, Vágvolgyi Cs, Pálfi Gy. (2016) *Mycobacterium tuberculosis* komplex kimutatása lipid biomarkerek segítségével. In: 15<sup>th</sup> International Conference on Applications of Natural, Technological and Economic Sciences (Szombathely, Hungary, 14 May 2016). Abstracts of the Presentations. Nyugat-magyarországi Egyetem, Szombathely, Hungary. 28.

Bereczki Zs, **Váradi OA**, Király K, Tóth N, Bukva M, Tihanyi B, Molnár E, Pálfi Gy. (2017) New cases of ritualistic cranial interventions from Hungary. In: 2<sup>nd</sup> Conference of the 'Török Aurél' Anthropological Association. Past and Present of Biological Anthropology. The Heritage of Török Aurél's Oeuvre (Târgu Mureş, Romania, 13–15 October 2017). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 17–18.

**Váradi OA**, Rakk D, Kecskeméti A, Bereczki Zs, Urbán E, Terhes G, Vágvolgyi Cs, Szekeres A, Pálfi Gy. (2017) *Mycobacterium tuberculosis* komplex okozta fertőzés kimutatása ásatag csontanyagból lipid biomarkerek segítségével. In: 16<sup>th</sup> International Conference on Applications of Natural, Technological and Economic Sciences (Szombathely, Hungary, 20 May 2017). Abstracts of the Presentations. Nyugat-magyarországi Egyetem, Szombathely, Hungary. 26.

**Váradi OA**, Rakk D, Kecskeméti A, Bereczki Zs, Urbán E, Terhes G, Vágvolgyi Cs, Minnikin, DE, Pálfi Gy, Szekeres A. (2017) Detection of ancient TB infection from bones on the base of specific lipid biomarkers. In: 19<sup>th</sup> Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and Abstracts (Szeged, Hungary, 9–10 June 2017). University of Szeged, Szeged, Hungary. 56.

**Váradi OA**, Rakk D, Kecskeméti A, Bereczki Zs, Urbán E, Terhes G, Vágvolgyi Cs, Szekeres A, Pálfi Gy. (2017) Verification of ancient TB infection cases using specific lipid biomarkers. In: 2<sup>nd</sup> Conference of the 'Török Aurél' Anthropological Association. Past and Present of Biological Anthropology. The Heritage of Török Aurél's Oeuvre (Târgu Mureş, Romania, 13–15 October 2017). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 11–12.

Spekker O, Hunt DR, **Váradi OA**, Berthon W, Pálfi Gy, Molnár E. 2018. Rare manifestations of spinal tuberculosis in the Robert J. Terry Anatomical Skeletal Collection (National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA). In 22<sup>nd</sup> European Meeting of the Paleopathology Association (Zagreb, Croatia, 28 August–1 September 2018). Book of Abstracts. Institute for Anthropological Research: Zagreb, Croatia; 59–60.

Király K, **Váradi OA**, Elekes G, Bukva M, Pintér Z, Molnár E, Pálfi Gy, Bereczki Zs. (2019) Clarifying the indication of surgical trepanations using statistical analysis. In: 3<sup>rd</sup> Conference of the 'Török Aurél' Anthropological Association. Ancient Humans, Ancient Diseases in Central and Eastern Europe (Târgu Mureş, Romania, 11–13 October 2019). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 29–30.

Molnár E, Hegyi A, Bereczki Zs, Pálfi Gy, Kis L, **Váradi OA**, Spekker O. (2019) An astonishing case of skeletal TB from the Árpadian Age cemetery of Győrszentiván (Győr-Moson-Sopron county, Hungary). In: 3<sup>rd</sup> Conference of the 'Török Aurél' Anthropological

Association. Ancient Humans, Ancient Diseases in Central and Eastern Europe (Târgu Mureş, Romania, 11–13 October 2019). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 27–28.

Pap I, Szikossy I, **Váradi OA**, Szekeres A, Bereczki Zs, Karlinger K, Pölöskei G, Csukovits A, Szvák E, Spigelman M, Donoghue HD, Maixner F, Zink A, Pálfi Gy. (2019) Pathological alterations caused by gout of an 18th century TB infected woman from the Vác Mummy Collection, Hungary. In: 3<sup>rd</sup> Conference of the ‘Török Aurél’ Anthropological Association. Ancient Humans, Ancient Diseases in Central and Eastern Europe (Târgu Mureş, Romania, 11–13 October 2019). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 21–22.

Pálfi Gy, Szikossy I, **Váradi OA**, Karlinger K, Maixner F, Pap I. (2019) Multidisciplinary study of an 18th century mummy (Vác, Hungary) – A possible TB-syphilis co-infection and other profession related changes. In: 3<sup>rd</sup> Conference of the ‘Török Aurél’ Anthropological Association. Ancient Humans, Ancient Diseases in Central and Eastern Europe (Târgu Mureş, Romania, 11–13 October 2019). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 20.

**Váradi OA**, Rakk D, Kecskeméti A, Terhes G, Spekker O, Vágvolgyi Cs, Szekeres A, Pálfi Gy. (2019) Optimization of lipid biomarker analysis revealing the ancient TB infections. In: 3<sup>rd</sup> Conference of the ‘Török Aurél’ Anthropological Association. Ancient Humans, Ancient Diseases in Central and Eastern Europe (Târgu Mureş, Romania, 11–13 October 2019). Program and Abstracts. Târgu Mureş, Romania. 25–26.